

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

GABRIEL BRUN VERGANI

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Área: Reprodução Animal

PALOTINA (PR)
2017

GABRIEL BRUN VERGANI

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONAD OBRIGATÓRIO

Trabalho de conclusão de curso apresentado, como parte das exigências para a conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Realizado na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio de Freitas

Supervisor: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Palotina (PR)

2017

FOLHA DE IDENTIFICAÇÃO

LOCAL DO ESTÁGIO: Setor de Caprinos e Ovinos – Embrapa Gado de Leite
Coronel Pacheco – Minas Gerais

Carga horária cumprida: 600 horas

Período de realização do estágio: 31/07/2017 a 17/11/2017

Supervisor: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Orientador: Prof. Dr. José Antônio de Freitas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus queridos pais, Rafael e Vania, por todo o amor, carinho, suporte e apoio nesta jornada, e que durante toda a minha vida sempre me incentivaram. Meu irmão Felipe, parceiro para a vida toda, meu melhor amigo.

Agradeço a toda minha família, por todo apoio e incentivo em continuar nesta caminhada. Amo todos vocês.

Ao meu amor e minha companheira Lettycia, por todo amor e carinho, sendo minha alegria diária, e incentivo para buscar sempre melhorar.

Agradeço ao meu Professor José, que se tornou um grande amigo. Obrigado por todas as oportunidades oferecidas, por poder participar de várias atividades no Setor de Pequenos Ruminantes. Espero poder retribuir um dia todas as oportunidades que me foram oferecidas. Obrigado por contribuir tanto para a minha formação.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante a graduação e estágio final, a todos que de alguma forma me motivaram a seguir este caminho. Obrigado pelos ensinamentos, pelas trocas de conhecimento, pelos conselhos para a vida.

Resumo

O presente trabalho de conclusão de curso apresenta as atividades realizadas na disciplina de Estágio Curricular Obrigatório realizado na área de reprodução animal sob orientação do professor Dr. José Antônio de Freitas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Setor Palotina. O estágio foi realizado na instituição de pesquisa Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite, em Coronel Pacheco – Minas Gerais, no Setor de Ovinos e Caprinos, da Embrapa Caprinos e Ovinos – Núcleo Regional Sudeste. No período de 31 de julho a 17 de novembro de 2017, sob supervisão do pesquisador Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca. Serão descritas neste trabalho as atividades e procedimentos acompanhados na área de Reprodução Animal durante o período do estágio, contemplando as atividades propostas no plano de atividades do estágio, assim como a descrição da estrutura e funcionamento do Setor de Ovinos e Caprinos. Será também apresentada uma revisão bibliográfica sobre tema de maior interesse.

Palavras-chave: Coleta de embriões, superovulação, ultrassonografia

ABSTRACT

The present work of conclusion of course presents the activities carried out in the discipline of Compulsory Curricular Internship in the area of animal reproduction under the guidance of Professor Dr. José Antonio de Freitas of the Federal University of Paraná - UFPR, Palotina Sector. The internship was carried out at the Brazilian Agricultural Research Corporation - Milk Cattle Research Institution, in Coronel Pacheco - Minas Gerais, in the Sheep and Goat Sector, Embrapa Goats and Sheep - Regional Sudeste Nucleus. In the period of July 31 to November 17, 2017, under the supervision of researcher Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca. This work will describe the activities and procedures followed in the area of Animal Reproduction during the period of the stage, contemplating the activities proposed in the activity plan of the stage, as well as the description of the structure and functioning of the Sheep and Goat Sector. A bibliographic review on a topic of major interest will also be presented.

Key words: Embryo collection, superovulation, ultrasound

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	PRÉDIO DA ADMINISTRAÇÃO DO CAMPO EXPERIMENTAL DE JOSÉ HENRIQUE BRUSCH (CEJHB) LOCALIZADO EM CORONEL PACHECO – MG.....	13
Figura 2	VISTA DE FRENTE DA SALA DE MANEJO DOS ANIMAIS E DOS DOIS PRIMEIROS ESTÁBULOS, NO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS, EMBRAPA GADO DE LEITE	14
Figura 3	BAIAS DAS FÊMEAS DO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS, NA EMBRAPA.....	16
Figura 4	<i>CREEP FEEDING</i> UTILIZADO PARA CORDEIROS EM LACTAÇÃO, DO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS.....	16
Figura 5	IMAGEM REALIZADA LOGO APÓS O PARTO DE DOIS CABRITOS, NO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS, DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO.....	20
Figura 6	PESAGEM DOS ANIMAS NO PRIMEIRO DIA DE VIDA, REALIZADA DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO NO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS.....	20
Figura 7	PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO UTILIZANDO HORMÔNIO FOLICULO ESTIMULANTE (FSH).....	24
Figura 8	CONTENÇÃO EM MACA ELEVADORA PARA A REALIZAÇÃO DE TRANSPOSIÇÃO CERVICAL E COLHEITA DE EMBRIÕES EM OVELHAS DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO.....	26
Figura 9	CLASSIFICAÇÃO RELACIONADA À APARÊNCIA EXTERNA DA CÉRVIX EM OVELHAS. (A) BICO DE PATO, (B) FENDA, (C) ROSA, (D) PAPILA E (E) ABA.....	28
Figura 10	VISUALIZAÇÃO DO ÓSTIO CERVICAL DE OVELHA, COM UTILIZAÇÃO DE ESPÉCULO VAGINAL DE COLLINS, DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO.....	29
Figura 11	DEMONSTRAÇÃO DA VISUALIZAÇÃO DO ÓSTIO CERVICAL DE OVELHA, APÓS A REALIZAÇÃO DO PINÇAMENTO LATERAL DA CÉRVIX COM PINÇAS DE POZZI.....	29

Figura 12	OBSERVAÇÃO DO ÓSTIO CERVICAL DE OVELHA, APÓS PINÇAMENTO E TRAÇÃO DA CÉRVIX COM PINÇAS DE POZZI, PARA COLHEITA DE EMBRIÕES PELA VIA TRANSCERVICAL REALIZADO DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO.....	30
Figura 13	IMAGENS EM MODO <i>DOPPLER</i> COLORIDO E MODO B DE OVÁRIO CONTENDO DOIS CORPOS LÚTEOS E UM FOLÍCULO.....	31
Figura 14	COLETA DE EMBRIÕES PELA VIA TRANSCERVICAL EM OVELHAS. OBSERVAÇÃO DA QUANTIDADE DE LÍQUIDO RECUPERADA APÓS APLICAÇÃO DE PBS INTRAUTERINO ATRAVÉS DE SISTEMA DE LAVAGEM UTERINA DESENVOLVIDO PELA EMBRAPA.....	33
Figura 15	VISUALIZAÇÃO DE ESTRUTURAS COLHIDAS POR VIA TRANSCERVICAL EM UMA OVELHA SUPEROVULADA DA RAÇA LACAUNE, CONTENDO EMBRIÕES EM ESTADO DE BLASTOCISTO E MÓRULA.....	34
Figura 16	ULTRASSONOGRAFIA TRANSRETAL EM PEQUENOS RUMINANTES PARA ACOMPANHAMENTO DE PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE CORPO LÚTEO ACESSÓRIO EM CABRAS E OVELHAS, REALIZADO DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	CASUÍSTICA DAS AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS REALIZADAS DURANTE PERÍODO DE ESTÁGIO NA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS – NÚCLEO SUDESTE.....	18
Tabela 2	PROTOCOLO EMBRAPA DE RELAXAMENTO CERVICAL E LAVAGEM UTERINA PELA VIA CERVICAL EM OVELHAS.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

CEJHB – Campo Experimental de José Henrique Brusch

TE – Transferência de Embrião

IA – Inseminação Artificial

PGF – Prostaglandina

FSH – Hormônio folículo estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

GnRH – Gonadotrofina

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

CIDR – *Controlled Internal Drug Release*

IM – Intramuscular

IV – Intravenoso

MG – Minas Gerais

PBS – Solução Salina Fosfato Tamponada

mm – Milímetros

mhz – Megahertz

MOET – Múltiplas ovulações e transferência de embriões

CL – Corpo lúteo

FOL - Folículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO	13
2.1	EMBRAPA - GADO DE LEITE	13
2.2	EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, NÚCLEO REGIONAL SUDESTE.....	14
2.2.1	ESTRUTURA FÍSICA E FUNCIONAMENTO DO NÚCLEO SUDESTE.....	14
3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO.....	18
3.1	ACOMPANHAMENTO DE PARTOS	19
3.2	COLETA DE EMBRIÕES PELA VIA TRANSCERVICAL	21
3.3	EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS.....	35
3.4	EXPERIMENTOS ACOMPANHADOS.....	37
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6	REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

Durante o curso de graduação, os graduandos têm a possibilidade de entrar em contato com várias áreas de atuação profissional, permitindo-lhes capacidade de escolha em suas áreas de preferência, na qual desejam atuar no mercado de trabalho.

Desta forma o estágio supervisionado obrigatório é uma oportunidade para o graduando entrar em contato com profissionais de áreas afins e aplicar os conhecimentos adquiridos durante o curso, de modo a gerar conhecimento prático mais profundo na área de interesse. Aprendendo novas técnicas, repassando conhecimento para outros estagiários e supervisores, ocorre uma grande troca de conhecimento durante todo o período de estágio. Deste modo, o acadêmico cria maior confiança em relação a si próprio e aos seus conhecimentos.

O estágio foi realizado na área de Reprodução Animal, sob orientação do professor Dr. José Antônio de Freitas, no Setor de Ovinos e Caprinos da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco, MG, sendo este local escolhido pelo pesquisador por ser referência nacional e internacional de reprodução em pequenos ruminantes, com o desenvolvimento de técnicas e tecnologias aplicadas a reprodução.

O presente trabalho tem por finalidade descrever a estrutura e funcionamento do local de estágio, apresentar e relatar as atividades realizadas durante o estágio na área de Reprodução Animal, assim como realizar uma breve revisão de literatura na área de reprodução de pequenos ruminantes.

2. DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DO ESTÁGIO

O estágio curricular foi realizado no Núcleo Regional Sudeste da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Caprinos e Ovinos, o qual está vinculado a EMBRAPA – Gado de Leite. Este está integrado ao Campo Experimental José Henrique Brusch (CEJHB) localizado em Coronel Pacheco – Minas Gerais. A sede administrativa da Embrapa Gado de Leite fica localizada em Juiz de Fora - MG. O período de estágio foi de 31 de Julho à 17 de Novembro de 2017.

2.1 EMBRAPA GADO DE LEITE

A Embrapa Gado de Leite foi fundada em 1974 no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais. É uma das 46 Unidades Descentralizadas da Embrapa. Atualmente a sede está localizada em Juiz de Fora (MG) e possui campos experimentais em Coronel Pacheco (MG) e Valença (RJ). Além de núcleos regionais que apoiam a transferência de tecnologia em cada região do país, esta unidade é referência mundial em pesquisas em pecuária leiteira de clima tropical. Na Figura 1 destaca-se o prédio administrativo do Campo Experimental da EMBRAPA.

FIGURA 1. FOTO DO PRÉDIO DA ADMINISTRAÇÃO DO CAMPO EXPERIMENTAL DE JOSÉ HENRIQUE BRUSCH (CEJHB) LOCALIZADO EM CORONEL PACHECO – MG.



Fonte: EMBRAPA.

2.2 EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, NÚCLEO REGIONAL SUDESTE

Fundada em 2002, está inserido dentro do CEJHB, localizado em Coronel Pacheco, e sua criação foi impulsionada pelo crescimento da produção de leite de caprinos na região. A instituição possui foco em pesquisas relacionadas a reprodução de ovinos e caprinos (Figura 2).

FIGURA 2. VISTA DE FRENTE DA SALA DE MANEJO DOS ANIMAIS E DOS DOIS PRIMEIROS ESTÁBULOS, NO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS, EMBRAPA GADO DE LEITE.



Fonte: EMBRAPA.

2.1.1 ESTRUTURA FÍSICA E FUNCIONAMENTO DO NÚCLEO SUDESTE

O horário de funcionamento do Núcleo Regional Sudeste da Embrapa – Caprinos e Ovinos, segue o padrão da fazenda como um todo, sendo de segunda a sexta-feira das 7:30 às 11:00 e das 12:00 às 16:30. Aos sábados, domingos e feriados, apenas os funcionários de plantão trabalham.

O Setor de Caprinos e Ovinos do Campo Experimental de Coronel Pacheco dispõe de um bloco apenas para a utilização ovinos e caprinos em experimentos. Neste bloco estão localizados os laboratórios para análise e congelamento de sêmen e de embriões, sala para análises hematológicas, sala

de estudos, escritório, banheiros e almoxarifado. Também há uma sala específica para a realização de atividades com os animais, onde são realizados os exames ultrassonográficos, coletas de embriões, coletas de sêmen e inseminações artificiais.

Ao lado da sala de manejo dos animais estão dispostas 8 baias com fêmeas que dão suporte ao manejo dos animais do setor, sendo as duas primeiras baias, denominadas enfermaria, onde permanecem apenas os animais que necessitam de medicações e cuidados intensivos. Estas baias possuem área coberta para proteção da chuva, com telhado e possui piso pavimentado, onde estão os comedouros, bebedouros e cocho de sal, também cada baia possui uma área de solário de chão batido. Utiliza-se o sistema de *creep feeding* para ovinos e caprinos, para acelerar o desmame e facilitar a recuperação da matriz como é possível observar na Figura 4. Possui um rebanho em torno de 150 animais, sendo estes caprinos e ovinos, separados por espécie, estado nutricional, reprodutivo e idade. Na Figura 3, é possível visualizar o local onde as fêmeas permanecem.

Possui ainda duas baias distantes das fêmeas, onde estão alocados os machos, que estão separados a uma distância de aproximadamente 450 metros e posicionamento no qual as fêmeas não sintam o cheiro e ouçam o barulho dos mesmos. Uma baia é destinada a carneiros e cordeiros desmamados, e outra para cabritos desmamados e bodes.

Uma baia das ovelhas prenhes e outra de cabras prenhes, possui um sistema de *creep feeding*, o qual proporciona um melhor desenvolvimento dos animais. Como é possível observar na figura 4.

FIGURA 3. BAIAS DAS FÊMEAS DO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS, NA EMBRAPA.



Fonte: EMBRAPA

FIGURA 4. *CREEP FEEDING* PARA CORDEIROS EM LACTAÇÃO, DO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS.



Fonte: EMBRAPA

O rebanho é composto por ovelhas predominantemente da raça Santa Inês, também possuindo ovelhas da raça Lacaune e cruzadas Lacaune x Santa Inês. Já as cabras, são representadas pelas raças Saanen, Pardo Alpino, Anglo Nubiano, Boer, e cruzadas meio sangue. Possui carneiros Dorper, Santa Inês e Lacaune; e bodes Pardo Alpino, Anglo Nubiano e cruzados.

A alimentação do rebanho é fornecida separadamente, sendo no período matutino a ração produzida na fazenda, contendo farelo de soja e milho, e no período da tarde é fornecida a silagem de milho, também produzida na fazenda.

Diariamente é feito a limpeza das baias, comedouros e bebedouros, a fim de controlar e diminuir a infecção por parasitas gastrointestinais nos animais do rebanho. Também, duas vezes por semana, é repostado o sal para os animais, de forma que nunca falte sal no cocho.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

Durante o estágio realizado no Núcleo Sudeste da Embrapa Caprinos e Ovinos, na área de reprodução de pequenos ruminantes, foi possível acompanhar o manejo dos animais do Setor, a utilização de fármacos para indução de cio, protocolos de superovulação, protocolos de dilatação cervical, coleta e análise de sêmen, auxílio e acompanhamento em partos de cabras e ovelhas, coleta de embriões pela via transcervical, inseminações transcervicais em cabras e ovelhas, avaliações ultrassonográficas do sistema reprodutor de cabras e ovelhas, dinâmica folicular ovariana, dinâmica luteal, diagnóstico de prenhez, auxílio em projetos de iniciação científica, experimento de indução de corpo lúteo acessório em cabras e ovelhas. Todos os procedimentos foram supervisionados pelo pesquisador responsável e pós-graduandos, orientados e coorientados pelo supervisor responsável.

TABELA 1: CASUÍSTICA DAS AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS REALIZADAS DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO NA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS – NÚCLEO SUDESTE.

Atividade realizada	Quantidade
Diagnóstico de Gestação	80
Dinâmica Folicular	272
Dinâmicas Luteais	229
Dinâmicas em modo Doppler Colorido	364

3.1 ACOMPANHAMENTO DE PARTOS

Durante o período de estágio foi possível assistir a um total de 20 partos, sendo estes 15 de cabras e cinco de ovelhas na Figura 5 é possível observar parto duplo de fêmea caprina. Durante esta atividade foi possível observar todas as etapas do parto, e em certos casos podendo intervir com auxílio obstétrico, quando fossem diagnosticadas distocias.

Foi necessária a intervenção obstétrica em apenas cinco partos, com a retirada manual, ou apenas reposicionamento do feto. As fêmeas eram monitoradas para saber se era necessário ou não auxiliá-las. Caso fosse necessário, a intervenção era realizada primeiramente com palpação vaginal, verificando a dilatação da cérvix, posicionamento fetal e, caso necessário, eram realizadas manobras obstétricas para reposicionamento fetal.

A tração dos fetos era realizada com cautela, acompanhando as contrações uterinas, utilizando luvas de palpação e lubrificação das mesmas. Após o parto, era feita aplicação de antibiótico de amplo espectro nas fêmeas que necessitassem da palpação intrauterina e reposicionamento fetal, devido a possível contaminação do útero. Também, em alguns casos que foram observados a baixa quantidade de contrações em algumas fêmeas, era aplicado cálcio na via subcutânea, de forma a evitar uma possível hipocalcemia, e assim melhorar as contrações.

Após o nascimento, eram realizadas a pesagem dos filhotes (Figura 6) e cura do umbigo com solução de iodo alcoólico 10%.

FIGURA 5. IMAGEM REALIZADA LOGO APÓS O PARTO DE DOIS CABRITOS, NO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS.



Fonte EMBRAPA.

FIGURA 6. PESAGEM DOS ANIMAS NO PRIMEIRO DIA DE VIDA, REALIZADA DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO NO SETOR DE CAPRINOS E OVINOS.



Fonte EMBRAPA.

3.2 COLETA DE EMBRIÕES PELA VIA TRANSCERVICAL

Durante o período de estágio foi possível acompanhar 12 tentativas de transposição cervical e lavagem uterina, com objetivo de coletar embriões em ovelhas. Assim, as atividades compreenderam na contenção das fêmeas, tricotomia para anestesia peridural, procedimentos anestésicos, tentativas de passagem transcervical, manipulação do sistema de lavagem dos cornos uterinos, e análise das estruturas recuperadas no lavado uterino.

Com o crescimento da cadeia produtiva de ovinos e caprinos, busca-se uma forma de melhorar o genótipo dos animais em sistemas de produção. A utilização de biotecnologias aplicadas a reprodução é uma ferramenta importante quando se deseja acelerar a multiplicação de animais com alto valor zootécnico, que com seu genótipo irão acrescentar grandes melhorias no rebanho. Quando o foco é nos machos, a melhor forma de multiplicar seu genótipo é através da inseminação artificial, sendo a mais eficiente e econômica forma de propagar seu genoma. Já para as fêmeas, o foco são os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET), a melhor forma de aumentar o número de suas progênies.

Estes programas são a soma de várias etapas para atingir o objetivo final que é o nascimento de embriões transplantados em fêmeas receptoras. Para isso são necessárias várias etapas, contemplando uma boa produção de embriões, que é possível com a utilização de protocolos de superovulação e um programa de acasalamento das fêmeas superovuladas, de forma a proporcionar uma alta taxa de prenhez, utilizando monta natural ou inseminação artificial. Após, é realizada a coleta destes embriões, avaliação e manipulação adequada para manter um número adequado de embriões viáveis, respeitando as normas vigentes (WRIGHT, 1999). Para finalizar o processo, é necessário realizar a transferência para fêmeas receptoras, com técnica adequada e técnico treinado, resultando em boas taxas de gestação e partos.

O ponto chave para o melhor resultado destes programas, está na colheita dos embriões, que pode ser realizado através de laparoscopia e laparotomia, ambas técnicas cirúrgicas. Também é possível através da forma não cirúrgica, pela via transcervical.

Para a realização da coleta transcervical em ovelhas é indispensável o conhecimento anatômico do sistema reprodutor ovino, que difere da maioria das outras espécies de interesse zootécnico, pois apresenta uma maior quantidade de projeções da cérvix chamados de anéis, podendo apresentar de 4 a 7, variando entre indivíduos. Estes anéis não apresentam uniformidade, desta forma o orifício de cada anel pode estar em uma posição diferente; além disso há diferença no espaçamento entre anéis, pois servem de barreira contra contaminações externas; e sua cérvix varia em comprimento de 5,7 a 10 cm e difere entre raças, idade e números de partos (MOURA et al., 2011).

A realização da técnica não cirúrgica tende a ser completamente adotada em relação a técnica cirúrgica em pequenos ruminantes, sendo estes procedimentos cirúrgicos restritos em alguns países. A coleta pela via transcervical difere principalmente das coletas cirúrgicas pela facilidade e simplicidade de um protocolo anestésico e analgésico local, diferente da anestesia geral necessária pelas vias cirúrgicas. Também, é possível realizar múltiplas coletas através da via transcervical em virtude de não ocorrer aderências uterinas comparado aos procedimentos cirúrgicos onde há realização de incisões para introdução da sonda no útero, diminuindo a vida útil das fêmeas que passam pelo processo cirúrgico (FONSECA, et al. 2016).

Outro fator positivo em relação ao procedimento não cirúrgico, é a não necessidade de manter os animais em jejum alimentar e hídrico, sendo liberados imediatamente. Após tal procedimento, os animais voltam ao seu comportamento natural em seus respectivos ambientes. Outra vantagem seria o menor tempo de realização da coleta na técnica não cirúrgica comparado aos métodos cirúrgicos, aumentando, a eficiência das coletas em vários animais (ANDRIOLI et al., 1999).

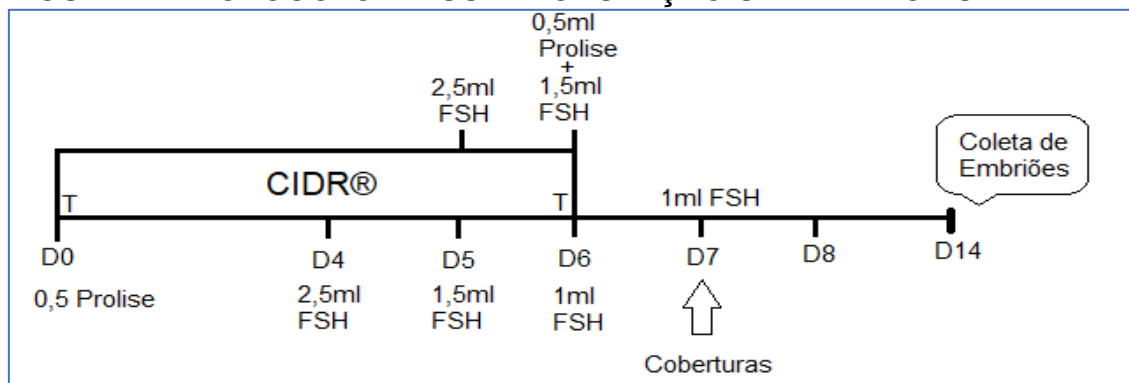
O primeiro passo para o sucesso de um programa de MOET é a superovulação das fêmeas doadoras. Para isto são utilizados diversos protocolos para estimular os folículos ovarianos, para bloquear o efeito de dominância folicular, e ou fornecer hormônio folículo estimulante (FSH) a todos os folículos responsáveis a este hormônio. São utilizados fármacos como gonadotrofina (GnRH), gonadotrofina coriônica equina (eCG) e o próprio FSH.

Esses hormônios possuem efeito direto ou indireto nos ovários, fornecendo maior suporte de FSH, desta forma estimulando a maturação de vários folículos.

Existem fatores relacionados a superovulação que podem influenciar negativamente no processo como um todo, reduzindo a quantidade de embriões coletados. Estes fatores estão relacionados a responsividade folicular ao FSH, falhas no corpo lúteo e ordem de coletas e também, fatores relacionados ao manejo como o estresse térmico, escore corporal e dieta. Primeiramente utilizavam-se eCG em altas doses, levando a baixas taxas ovulatórias e alta indução de cistos foliculares. Outro fator prejudicial da utilização de altas doses de eCG é a resposta imunológica gerada pelas aplicações deste hormônio, que em fêmeas que foram submetidas a várias superestimulações, o efeito tende a reduzir por conta da resposta imune destruindo este hormônio. Posteriormente começou a utilização de extratos hipofisários de cérebro suínos, que contem FSH e LH, porém há muita variação na quantidade de cada hormônio dependendo da qualidade do processamento deste extrato. (GOMES et al., 2014)

O protocolo demonstrado na Figura 7 se inicia com a introdução de implante intravaginal de silicone impregnado com 0,33 g de progesterona em forma de T (CIDR®, InterAg, Nova Zelândia), no dia denominado D0, juntamente com aplicação de PGF2 α (d-Cloprostenol) (Prolise, TECNOPEC LTDA. São Paulo), na dose de 0,5mL por animal pela via intramuscular no período da tarde. No D4 iniciam-se as aplicações de FSH (PLUSET®, Hertape Calier), com diluição de 250 UI.mL⁻¹, no período da tarde, com aplicação de 2,5 mL intramuscular; D5 aplicação no período da manhã de 2,5 mL e no período da tarde 1,5 mL de FSH; D6 aplicação de PGF2a e também 1,5 mL de FSH no período da manhã, no turno da tarde aplicação de 1ml de FSH e retirada do implante intravaginal. D7 aplicação de 1 mL de FSH no período da manhã, e no turno da tarde inicia a cobertura destas fêmeas.

FIGURA 7. PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO UTILIZANDO FSH.



Fonte: Arquivo pessoal.

Esta etapa pode ser realizada de duas formas, com a monta natural ou com inseminação artificial (IA), sendo esta, a forma mais eficaz de maximizar a capacidade de geração de descendentes de um reprodutor. Para a realização desta técnica existem diferentes vias e métodos para concluir o objetivo final que é a fecundação do óvulo liberado na ovulação. Para isto é feita a escolha do tipo do sêmen, este fresco, refrigerado ou congelado, dependendo da forma que será aplicado no aparelho reprodutor da fêmea (OLIVEIRA & FONSECA, 2013).

Este procedimento pode ser realizado de diferentes formas, dependendo do tipo de sêmen escolhido, sendo fresco, refrigerado ou congelado. O objetivo é a deposição do sêmen na porção mais cranial do sistema reprodutor feminino, reduzindo o tempo para que ocorra a fecundação. São descritos métodos como inseminação artificial vaginal, com a deposição de sêmen fresco com baixas diluições (500×10^6 espermatozoides por dose) direto na vagina das fêmeas. Porém este método apresenta baixas taxas de prenhez comparado as demais técnicas.

A inseminação pericervical é realizada a partir da localização do óstio cervical, através de espéculo vaginal e luz, depositando o sêmen dentro do orifício, sem a tentativa de ultrapassar mais anéis cervicais. Também é indicado a utilização de sêmen fresco com diluição maior (200 a 300×10^6 espermatozoides por dose).

A inseminação cervical profunda ou intrauterina pela via cervical, é realizada a partir da localização do óstio cervical (espéculo e luz), uso de instrumentos para fixar a cérvix (pinças e aplicadores), deposição de sêmen mais

profunda possível (entre 2 – 4 cm), com transposição dos anéis cervicais. Necessita de um técnico capacitado e bem treinado. Em cabras esta técnica tem melhor resultado devido a facilidade de transpor os anéis. Em ovelhas é mais reduzida a taxa de prenhez, requer cuidados ao manuseio para não ocorrer a perfuração da cérvix e também do corpo do útero, indica-se uso de sêmen fresco com alta diluição ($100 - 150 \times 10^6$ espermatozóides por dose), a efetividade desta técnica está diretamente relacionada à quantidade de anéis transpostos.

Por fim a inseminação intrauterina por laparoscopia, que é uma técnica cirúrgica que requer matérias de alto valor, sendo realizada exclusivamente por veterinários. Nesta técnica a deposição de sêmen é feita diretamente dentro dos cornos uterinos, sendo necessário anestesia e/ou sedação, tricotomia onde será feita a introdução do laparoscópio, e antibioticoterapia em alguns casos. É possível a utilização de sêmen fresco, resfriado ou congelado/descongelado (100×10^6 espermatozóides por dose). Devido a ser um procedimento cirúrgico, existem riscos como a perfuração da bexiga, perfurações gastrointestinais e de vasos sanguíneos, porém é a técnica que apresenta a maior taxa de fertilidade devido a posição em que é depositada o sêmen, o mais próximo possível da tuba uterina (FONSECA et al., 2014).

Inicialmente era realizada a tricotomia da região da base da cauda, retirada de fezes da ampola retal, higienização da região perianal com água limpa e detergente, para retirada de todo material fecal da região do ânus e da vulva, sem necessidade de utilizar produtos à base de álcool. Após a limpeza, a fêmea era posicionada dentro da maca elevadora de contenção, em posição quadrupedal, para evitar movimentações bruscas da fêmea durante a coleta, como pode ser observado na Figura 8.

FIGURA 8. CONTENÇÃO EM MACA ELEVADORA PARA REALIZAÇÃO DA TENTATIVA DE TRANSPOSIÇÃO CERVICAL E COLETA DE EMBRIÕES EM OVELHAS.



Fonte: EMBRAPA

Para a realização da coleta transcervical em ovelhas é necessário induzir a dilatação da cérvix, mimetizando o estado da cérvix quando está no estro, onde há uma dilatação natural da cérvix para facilitar a passagem do sêmen. Assim era utilizado um protocolo denominado Protocolo Embrapa de dilatação cervical com a utilização de cloprostenol, estrógeno e ocitocina, descrito na Tabela 2. O protocolo teve início no dia anterior a coleta, cerca de 17-18 horas antes da hora marcada para coleta.

A tentativa de transposição cervical em ovelhas sem protocolo de dilatação cervical tem um índice muito baixo de sucesso, sendo em sua maioria impossível a transposição (GUSMÃO, et al., 2009), já em cabras a taxa de passagem é mais elevada mesmo sem protocolo de dilatação. (ANDRIOLI et al., 1999)

TABELA 2. PROTOCOLO EMBRAPA DE RELAXAMENTO CERVICAL E LAVAGEM UTERINA PELA VIA CERVICAL EM OVELHAS.

FÁRMACO		Dose	Tempo pré-coleta	Via de administração
Benzoato	de	1 mg	18h	IM
Estradiol				
d-Cloprostenol		37,5 µg	18h	IM
Ocitocina		50 UI	20min	IV

Tempo pré-coleta – Tempo anterior ao início da colheita de embriões

IM – Intramuscular

IV – Intravenoso

Primeiramente era aplicado 50 UI de ocitocina IV, então eram iniciados os procedimentos de sedação e analgesia, e após o tempo necessário para início do efeito da ocitocina, 20 min, a fêmea é elevada em maca elevadora.

Feita a contenção da fêmea, era realizada a anestesia no espaço epidural na região sacrococcígea com 2 mL de lidocaína a 1%, após a área de aplicação ser higienizada adequadamente. Posteriormente foi aplicado Acepromazina 1% na proporção de 1mL/100kg, gerando uma leve sedação na paciente, desta forma facilitando o manejo do espécule e pinçamento. Também foram aplicados 5 ml de escopolamina, na concentração de 4mg, pelas vias IM e IV, fornecendo uma analgesia visceral.

Em seguida era introduzido um espécule vaginal do tipo Collins de número 0 a 3, dependendo do tamanho externo da vulva e interno da vagina respeitando-se a anatomia da fêmea, para explorar a vagina e cérvix, de modo a visualizar nitidamente a projeção do último anel cervical, denominado óstio cervical, e apresenta diferentes formas, variando em tamanho e forma entre indivíduos (KERSHAW et al., 2005), como pode ser observado na Figura 9 e Figura 10.

FIGURA 9. CLASSIFICAÇÃO RELACIONADA À APARÊNCIA EXTERNA DA CÉRVIX EM OVELHAS. (A) BICO DE PATO, (B) FENDA, (C) ROSA, (D) PAPILA E (E) ABA.



Fonte: KERSHAW et al. (2005)

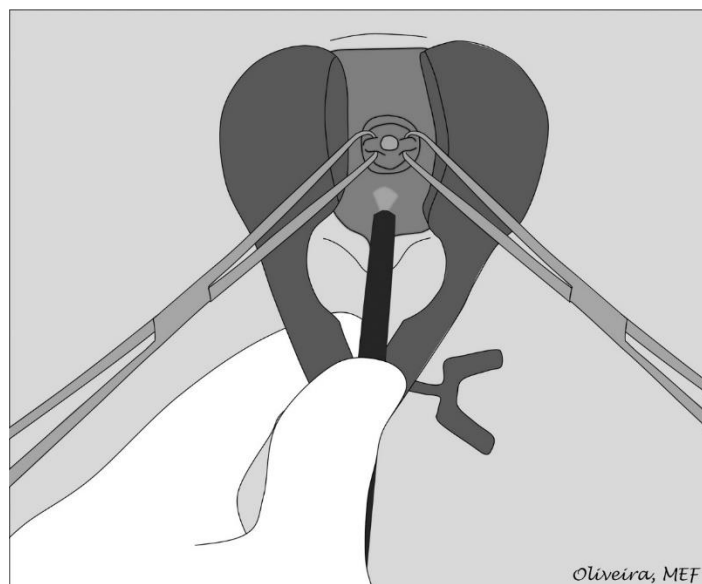
Com auxílio de luz e pinças, é feito o pinçamento com uma pinça de apreensão de Allis (26 cm), modificada (com os dentes gastos), atraumática, para fixação da cérvix. Após a fixação com a pinça de Allis é feito o pinçamento utilizando duas pinças de Pozzi, lateralmente ao óstio cervical, resguardando a não oclusão do lúmen cervical, assim dificultando ou impossibilitando a passagem. Após o pinçamento com as pinças de Pozzi (Figura 11), é retirado o espécule e introduzido a gaze embebida em lidocaína, que é depositada no fundo do saco vaginal, para melhorar o conforto e analgesia do local. Após dois minutos iniciava-se a tração da cérvix, tracionando lateralmente e com intensidade leve para relaxar a musculatura. Então era possível visualizar o óstio cervical e a entrada do primeiro anel (Figura 10).

FIGURA 10. VISUALIZAÇÃO DO ÓSTIO CERVICAL DE OVELHA, COM UTILIZAÇÃO DE ESPÉCULO VAGINAL DE COLLINS, DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO.



Fonte: EMBRAPA

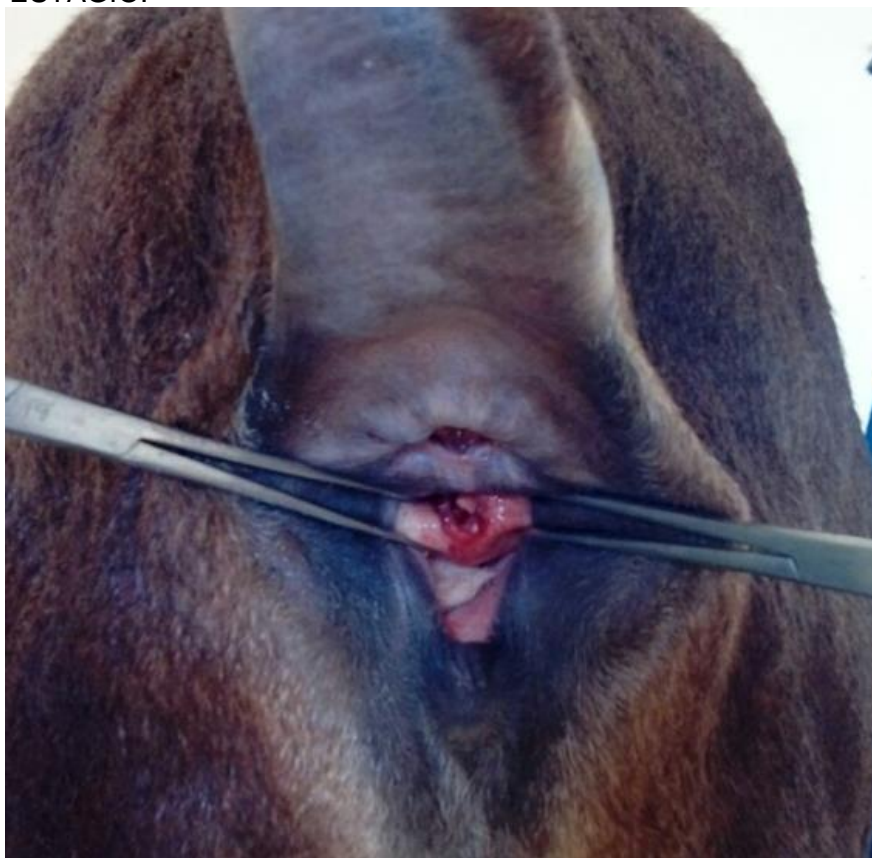
FIGURA 11. DEMONSTRAÇÃO DA VISUALIZAÇÃO DO ÓSTIO CERVICAL DE OVELHA, APÓS A REALIZAÇÃO DO PINÇAMENTO LATERAL DA CÉRVIX COM PINÇAS DE POZZI.



Fonte: FONSECA et al. 2016

Após a visualização do óstio cervical (Figura 12), era iniciado a tentativa de passagem dos anéis cervicais com uma haste de aço cilíndrica de ponta romba, desenvolvida justamente para este fim, com o intuito de dilatar mais os anéis, e descobrir as aberturas de todos os anéis. Com a introdução da haste dentro da cérvix, era possível a utilização dos dedos do técnico por baixo e por cima da cérvix, no intuito de movimentá-la, para manipular ela de forma a facilitar a passagem pelos anéis. Após a passagem de alguns anéis, era realizada a colocação do dedo médio dentro do reto da fêmea, para conseguir continuar manipulando a cérvix, devido ao comprimento da mesma. Era realizada com cautela a manipulação com a haste, não forçando demais a passagem pela cérvix, para não ocorrer rupturas cervicais, pois se ocorresse não era possível realizar a coleta, desta forma era abortada a tentativa.

FIGURA 12. OBSERVAÇÃO DO ÓSTIO CERVICAL DE OVELHA, APÓS PINÇAMENTO E TRAÇÃO DA CÉRVIX COM PINÇAS DE POZZI, PARA COLHEITA DE EMBRIÕES PELA VIA TRANSCERVICAL, REALIZADO DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO.



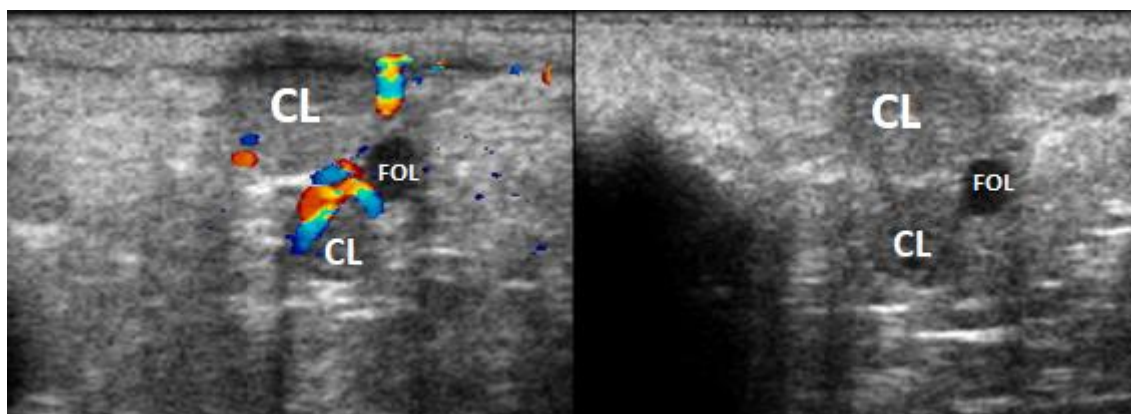
Fonte EMBRAPA

Quando ultrapassados todos os anéis, era sensível a não resistência da haste quando introduzida e tracionada. A haste era deixada por alguns minutos dentro da cérvix para dilatar e moldar o caminho dos anéis para o próximo processo, que era a introdução de uma sonda guiada por um mandril.

Fazia-se a retirada da haste rapidamente e em seguida já era introduzido do mandril com a sonda, iniciando novamente a tentativa de passagem da cérvix, aproveitando o modelamento realizado pela haste, sendo possível passar os dois ou três primeiros anéis facilmente. Novamente com a devida precaução para não ocorrer perfuração da cérvix e do útero caso ultrapassasse a cérvix, era realizada a manipulação com os dedos e com o mandril para realizar a passagem dos demais anéis. Após a transposição dos anéis era direcionado lateralmente para seguir dentro de um corno uterino de escolha, que fora diagnosticado com o exame ultrassonográfico no dia anterior a coleta. Era visualizado e quantificado o número de corpos lúteos em cada ovário, desta forma indicando quantos possíveis embriões seriam coletados em cada corno, como é possível observar na Figura 13, na qual possui dois corpos lúteos.

Também podem ser realizadas laparoscopias para visualização dos ovários e quantificação do número de corpos lúteos presentes, porém é uma técnica mais invasiva, comparada a utilização da ultrassonografia.

FIGURA 13. IMAGENS EM MODO DOPPLER COLORIDO E MODO B DE OVÁRIO CONTENDO DOIS CORPOS LÚTEOS E UM FOLÍCULO.



CL – Corpo lúteo

FOL - Folículo

Fonte: EMBRAPA

Então, é introduzido levemente a sonda, para dentro do útero e retirando o mandril, para não dobrar a sonda no interior do útero e alcançar o mais próximo possível da tuba uterina.

Após a introdução da sonda, era injetado 2 mL de ar para confirmar se estava realmente no útero. Se houvesse pressão a sonda ainda estava na cérvix, sendo retirada a sonda e reiniciado o processo com o mandril.

Caso fosse confirmada a posição da sonda dentro do útero, a sonda era acoplada ao sistema de lavagem uterina desenvolvido e patenteado pela Embrapa. São introduzidos 20 mL de solução específica para coleta de embriões (DMPBS, Biodux), aquecido a 37° C, para lubrificar o sistema e para o primeiro lavado uterino não ser depositado diretamente sobre a peneira do filtro. Então eram inseridos 180 ml de DMPBS por corno uterino, em doses de 10 mL por vez, e por gravidade este líquido que é inserido no útero retorna pelo sistema até o filtro (Figura 14).

Após lavagem dos dois cornos, era feita novamente a limpeza do sistema com 20 mL de solução, para prevenir que algum embrião possa ter permanecido dentro do sistema. Eram realizadas manobras com a sonda dentro do útero para recolhimento de todo o líquido, puxando a sonda e empurrando, para sugar possíveis bolsões de líquido que podem se formar dentro dos cornos uterinos. No total eram inseridos 360 ml de solução por ovelha.

A taxa de recuperação varia de acordo com o método de coleta, porém em sua maioria as taxas de coleta são muito elevadas, superiores a 90%, para ambas espécies, caprina e ovina (FONSECA et al. 2016).

FIGURA 14. COLETA DE EMBRIÕES PELA VIA TRANSCERVICAL EM OVELHAS. OBSERVAÇÃO DA QUANTIDADE DE LÍQUIDO RECUPERADA APÓS APLICAÇÃO DE PBS INTRAUTERINO ATRAVÉS DE SISTEMA DE LAVAGEM UTERINA DESENVOLVIDO PELA EMBRAPA.

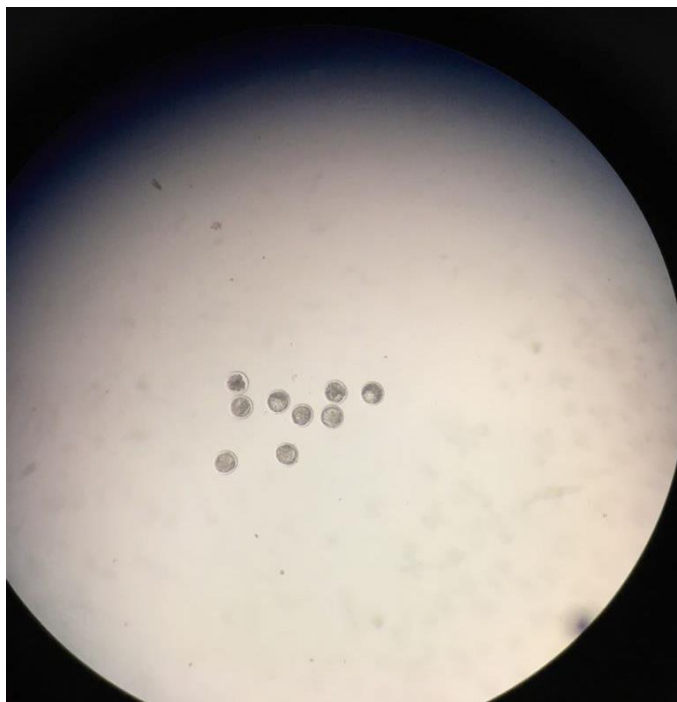


Fonte: EMBRAPA

Após o procedimento de lavagem uterina, era realizada a antibioticoterapia e o animal estava apto a retornar para sua baia. Comparado ao procedimento cirúrgico, que o animal necessita de anestesia geral, que é um fator de risco, somado as complicações que o procedimento cirúrgico pode causar com sucessivas coletas, como aderência uterina, impedindo novas coletas, o fator estressante de jejum, hídrico e alimentar, que não é necessário na coleta pela via transcervical. São vários fatores positivos em relação a coleta não cirúrgica com relação a cirúrgica, porém a técnica transcervical necessita de um profissional bem treinado e capacitado para realização, devido à complexidade do processo de transposição da cérvix.

Após a coleta, o restante do lavado uterino que permaneceu no filtro, cerca de 20 a 30 ml, onde estavam as estruturas coletadas e possíveis embriões, era depositado em uma placa de Petri com marcações de quadrados, e visualizado em um estereomicroscópio com aumento de 2x (Figura 15), para a procura dos embriões. Então eram retirados desta primeira placa e passados para outra placa de Petri contendo DMPBS, depositando todos próximos para contagem.

Figura 15. Visualização de estruturas coletadas via transcervical em uma ovelha superovulada da raça Lacaune, contendo embriões em estado de blastocisto e mórula.



Fonte: EMBRAPA

Após o término da análise e classificação dos embriões e ou estruturas coletas, o próximo passo era o congelamento destes embriões, porém não foi possível acompanhar este procedimento durante o período de estágio.

3.3 EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS

Outra ferramenta que fornece um suporte ao programa é a realização de exames ultrassonográficos antes e durante a realização do programa, sendo possível diagnosticar distúrbios reprodutivos, acompanhar o efeito estimulatório nos ovários, as respostas da fêmea ao protocolo, principalmente antes da coleta, para certificar se é viável a realização da coleta, e a contagem de quantos possíveis embriões serão coletados em cada lado do útero. É possível a utilização desta forma menos invasiva de avaliação ovariana em substituição da laparoscopia em ovinos (PINTO et al., 2016).

Durante o procedimento de indução de superovulação foram realizados exames ultrassonográficos do sistema reprodutor das ovelhas, utilizando dois equipamentos, Mindray 3300 DP Vet, com probe retal linear e frequência de 7,5 MHz. E um Mindray M5 Vet, com software Doppler Colorido e probe retal linear com frequência de 7,5 MHz. É possível visualizar na Figura 16 como eram realizados os exames nos pacientes contidos em um tronco específico para pequenos ruminantes.

FIGURA 16. ULTRASSONOGRAFIA TRANSRETAL EM PEQUENOS RUMINANTES PARA ACOMPANHAMENTO DE PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE CORPO LÚTEO ACESSÓRIO EM CABRAS E OVELHAS, REALIZADO DURANTE PERÍODO DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO.



Fonte: EMBRAPA

Logo no D0 foram realizados exames ultrassonográficos de todas as ovelhas que passaram pelo protocolo diariamente até a data de início das coberturas, acompanhando a regressão de corpos lúteos de ciclos anteriores, e regressão folicular, e início de uma nova onda de folículos, até o momento onde iniciou-se as aplicações de FSH. Onde foi observado a resposta destas ovelhas ao protocolo, com o aumento do tamanho de vários folículos em ambos os ovários, diferenciando da fisiologia, onde apenas 1 a 2 folículos em média dependendo da raça, chegam ao tamanho pré-ovulatório que varia de 7 a 10 mm (RAVINDRA et al., 1994).

No dia anterior das coletas dos embriões foram realizados novos exames, para contagem de corpos lúteos presentes, como forma de contagem de quantos embriões poderiam ser coletados, indicando também qual o melhor lado para começar, onde possui maior quantidade de possíveis embriões, como pode ser observado na Figura 13, apresentando 2 corpos lúteos.

3.4 EXPERIMENTOS ACOMPANHADOS

Durante período do estágio foi possível acompanhar experimentos envolvendo protocolos de indução de corpo lúteo acessório em cabras e ovelhas, e observação e classificação de muco cervical em cabras e ovelhas.

Um grupo de 24 animais envolvendo 12 cabras e 12 ovelhas foram sincronizadas com implante intravaginal por seis dias e aplicação após a colocação do implante de uma dose de PGF, e posteriormente com aplicações de PGF e eCG no dia anterior a retirada do implante com progesterona. Foram realizados exames ultrassonográficos a partir do dia da colocação do implante intravaginal, até a confirmação da ovulação após as coberturas.

Após a retirada do implante, as fêmeas foram colocadas em baias junto a um reprodutor para detecção de cio. Sendo este apresentado apenas 24 horas após a retirada dos implantes.

A partir da data da exposição das fêmeas aos machos, foram realizadas fotografias da região cervical das fêmeas, com utilização de espéculo e luz para melhor visualização da cérvix. Também realizadas amostras citológicas da parede vaginal com swab, e após fixação em lamina e coradas com reagentes específicos para células epiteliais.

Foram realizadas coletas de sangue a partir da data da colocação do implante, diariamente no período da manhã, com tubo a vácuo com anticoagulante. Após as coletas as amostras de sangue eram centrifugadas, e então retirado o plasma e depositado em microtubo de 1,5 mL, e então armazenados em congelador com temperatura de - 24°C para posterior análise da progesterona sanguínea.

As coberturas foram realizadas da seguinte forma: Foram divididas em dois grupos as fêmeas, metade iria receber uma monta e após 12 horas seriam inseminadas, e outra metade receberiam duas montas dos machos, com espaço de 12 horas, caso apresentasse cio. O carneiro utilizado era da raça Santa Inês, e o sêmen utilizado era de um carneiro da raça Lacaune. Já para as cabras, o bode utilizado era da raça Pardo Alpino, e o sêmen de um Anglo Nubiano. Sendo possível acompanhar e realizar inseminação tanto em cabras como ovelhas.

O muco era classificado conforme apresentação da coloração do muco e presença ou não de estrias. Sendo de 1 a 5, 1 - completamente cristalino, 2 - cristalinos com estrias brancas, 3 – estriado, 4 - estriado/caseoso e 5 - caseoso.

Após uma semana da data de cobertura destas 24 fêmeas, apenas 21, sendo 11 ovelhas e 10 cabras, receberam uma aplicação única de 300UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG), dando início ao experimento de indução de corpo lúteo acessório, aproveitando que estas já estavam sincronizadas devido ao protocolo de indução de cio utilizado anteriormente.

As coletas de sangue continuaram, porém com intervalos entre dias, sendo o D0, no dia da aplicação e após nos, D7, D11, D13, D17, D21 e D30. Sendo realizadas e centrifugadas do mesmo método no experimento anterior de muco cervical.

A indução de corpo lúteo acessório tem como objetivo, aumentar a quantidade de progesterona sérica no sangue, desta forma aumentar a taxa de gestação. Podem ser utilizados diferentes fármacos para indução de ovulação acessória, como por exemplo, GnRH, hCG e o próprio LH; Atuando de forma direta ou indireta no ovário, proporcionando suporte para os folículos com capacidade ovulatória de realizarem a ovulação (FERNANDEZ, et al. 2018).

Fisiologicamente, após uma ovulação durante o ciclo estral, há o recrutamento de uma nova onda de folículos, onde no sétimo dia após a ovulação do último ciclo, existem folículos com capacidade ovulatória, porém estes não conseguem ovular, devido ao *feedback* negativo que a progesterona produzida pelo corpo lúteo presente causando diminuição de liberação de estrógeno e LH que são necessários para que ocorra a ovulação. Então são utilizados fármacos, para indução de ovulação, assim havendo formação de corpos lúteos acessórios, que também produzem progesterona, havendo uma maior proporção deste hormônio no sangue das fêmeas que recebem o protocolo, maior número de corpos lúteos e maior taxa de gestação, assim aumentando a produção do sistema de criação (LANKFORD, et al. 2010).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de estágio foi possível acompanhar muitos procedimentos na área de reprodução animal, grande número de atividades foram desenvolvidas. Proporcionando a obtenção conhecimento prático e teórico mais aplicado. O estágio foi de grande valia para a formação acadêmica e profissional, aumentando a confiança do graduando.

Foi possível conhecer muitas pessoas de renome na área, inclusive o supervisor, que é referência na área de reprodução. Abrindo novos horizontes e formando amizades. Trabalhando em conjunto com outros colegas de estágio e alunos da pós-graduação, sendo fundamental um bom trabalho em equipe.

O estágio curricular proporciona um grande acúmulo de conhecimento para o graduando, sendo de vital importância durante o período acadêmico. Preparando o aluno para o mercado de trabalho.

5. REFERÊNCIAS

ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A. A.; SOARES, A. T.; VISINTIN, J. A. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** vol.36 n.3 São Paulo 1999.

FERNANDEZ, J.; BRUNO-GALARRAGA, M. M.; SOLO, A. T.; de la Sota, R. L.; CUETO, M. I.; LACAU, I. M.; GIBBONS, A. E. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. **Theriogenology**, v. 105, p. 184-188, 2018.

FONSECA, J. F. Inseminação Artificial. In: FONSECA, J. F.; CRUZ, R. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; VIANA, J. H. M. **Bioteχνologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos**. 1º edição, Embrapa, Brasília. p. 32 – 44, 2014.

FONSECA, J. F.; SOUZA-FABJAN, J.M.; OLIVEIRA, M. E. F.; LEITE, C. R.; NASCIMENTO-PENIDO, P. M.; BRANDÃO, F. Z.; LEHLOENYA, K. C. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology** v. 86, p. 144–151, 2016.

GOMES, M. G. T.; VARAGO, F. C.; HENRY, M. R. J. M.; BORGES, I.; MARTINS, T. L. T.; FERREIRA, D. A. Fatores que interferem na transferência de embriões em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.1, p15-24, jan./mar. 2014.

GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; BITTENCOURT, T. C. C.; MARTINS, L. E. P.; GORDIANO, H. D.; BARBOSA, L. P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.2, p.313-318, 2009.

RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. **Journals of Reproduction and Fertility**, 101, p. 501-509, 1994.

KERSHAW, C. M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M. R.; INGRAM, K.; LEETHONGDEE, S.; WAX, G.; SCARAMUZZI, R. J. The anatomy of the sheep cervix and its influence of the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, New York, v. 64, p.1225-1235, 2005.

LANKFORD, L. M.; YATES, D. T.; HALALSHEH, R. A.; BLACK, P. L.; HALLFORD, D. M.; ROSS, T. T. Effects of human chorionic gonadotropin on serum progesterone concentrations, embryonic survival, and lambing rates in ewes. Proceedings, Western Section, **American Society of Animal Science**. Vol 61, 2010.

GOMES, M. G. T.; VARAGO, F. C.; HENRY, M. R. J. M.; BORGES, I.; MARTINS, T. L. T.; FERREIRA, D. A. Fatores que interferem na transferência de embriões

em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.1, p15-24, jan./mar. 2014.

MOURA, D. S.; LOURENÇO, T. T.; MOSCARDINI, M. M.; SCOTT, C.; FONSECA, P. O.; SOUZA, F. F. Aspectos morfológicos da cérvix de ovelhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, supl. 1, p. 33-38, dez., 2011.

OLIVEIRA, M. E. F.; FONSECA, J. F. da; Inseminação artificial. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. São Paulo: MedVet, 2013, p. 91-102.

PINTO, P. H. N. ; BRAGANCA, G. M. ; LEITE, C. R. ; SANTOS, G. B. ; ROSA, R. M. ; ALFRADIQUE, V. A. P. ; GONCALVES, L. H. S. ; BALARO, MARIO FELIPE ALVAREZ ; FONSECA, J. F. ; BRANDÃO, F. Z. . Color Doppler ultrasound as a substitute to laparoscopy for the CL count in superovulated sheep. In: 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2016, Belo Horizonte. **Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**. Belo Horizonte: Animal Reproduction, 2016. v. 13. p. 473.

WRIGHT, J. M. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento do embrião e códigos de qualidade. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões: um guia de procedimento e informação geral para uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias**. 3. ed. Uberlândia: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. p.173-176.